

学校编码: 10384
学号: 22420100153591

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

大黄鱼干细胞诱导相关多能性因子的克隆 与表达分析

Cloning and expression patterns of stem cells
induction-associated pluripotency factors in large yellow
croaker *Larimichthys crocea*

姜永华

指导教师姓名: 洪万树教授
专 业 名 称: 海洋生物学
论文提交日期: 2016 年 8 月
论文答辩时间: 2016 年 8 月

2016 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	IV
缩略语表	VIII
第一章 绪论	1
1.1 诱导性多能干细胞 (iPSCs) 技术的研究进展	1
1.1.1 经典 DNA 法	1
1.1.2 蛋白质法	1
1.1.3 小分子化合物法	2
1.1.4 仙台病毒法	2
1.1.5 RNAs 法	2
1.2 多能性因子的研究进展	6
1.2.1 Oct4	6
1.2.2 Sox2	8
1.2.3 Klf4	11
1.2.4 cMyc	13
1.3 本研究的目的是和意义	14
1.3.1 目的意义	14
1.3.2 技术路线	16
参考文献	16
第二章 大黄鱼多能性因子的克隆与分析	32
2.1 材料	32
2.1.1 实验鱼	32
2.1.2 药品试剂	32
2.1.3 实验仪器设备	33
2.1.4 溶液配制	33
2.1.5 引物	33

2.2 方法	36
2.2.1 总 RNA 的提取.....	36
2.2.2 RNA 逆转录为 cDNA 第一链	36
2.2.3 扩增目的基因全长 cDNA.....	37
http://phtv.ifeng.com/program/txbwl/2.2.4 PCR 产物的回收及纯化.....	38
2.2.5 目的片段与载体连接	39
2.2.6 感受态细胞的转化及筛选	39
2.2.7 阳性克隆的检测	39
2.2.8 质粒测序	40
2.2.9 目的基因 cDNA 全序列的获得.....	40
2.2.10 目的基因的生物信息学分析	40
2.3 结果	41
2.3.1 <i>Lc-Oct4</i> 基因 cDNA 全长序列、氨基酸序列及系统进化分析.....	41
2.3.2 <i>Lc-Sox2</i> 基因 cDNA 全长序列、氨基酸序列及系统进化分析.....	48
2.3.3 <i>Lc-Klf4</i> 基因 cDNA 全长序列、氨基酸序列及系统进化分析.....	54
2.3.4 <i>Lc-cMyc</i> 基因 cDNA 全长序列、氨基酸序列及系统进化分析.....	62
2.4 讨论	69
2.4.1 <i>Lc-Oct4</i> 基因	69
2.4.2 <i>Lc-Sox2</i> 基因	71
2.4.3 <i>Lc-Klf4</i> 基因	72
2.4.4 <i>Lc-cMyc</i> 基因	73
参考文献	75
第三章 大黄鱼多能性因子的时空表达	79
3.1 材料	79
3.1.1 实验鱼	79
3.1.2 药品试剂	80
3.1.3 实验仪器设备	81
3.1.4 溶液配制	81
3.1.5 引物	82
3.2 方法	84
3.2.1 荧光定量 PCR (qRT-PCR)	84

3.2.2 原位杂交	85
3.3 结果	90
3.3.1 大黄鱼 <i>Lc-Oct4</i> 基因的时空表达模式	90
3.3.2 大黄鱼 <i>Lc-Sox2</i> 基因的时空表达模式	100
3.3.3 大黄鱼 <i>Lc-Klf4</i> 基因的时空表达模式	107
3.3.4 大黄鱼 <i>Lc-cMyc</i> 基因的时空表达模式	117
3.3.5 大黄鱼各多能性因子的表达谱比较	128
3.4 讨论	132
3.4.1 <i>Lc-Oct4</i> 基因	132
3.4.2 <i>Lc-Sox2</i> 基因	134
3.4.3 <i>Lc-Klf4</i> 基因	136
3.4.4 <i>Lc-cMyc</i> 基因	139
3.4.5 大黄鱼各多能性因子的表达谱比较	142
参考文献	143
第四章 大黄鱼多能性干细胞诱导初探	151
4.1 材料	151
4.1.1 实验鱼	151
4.1.2 药品试剂	151
4.1.3 实验仪器设备	152
4.1.4 溶液配制	152
4.2 方法	153
4.2.1 细胞培养	153
4.2.2 基因转染	154
4.3 结果	156
4.3.1 大黄鱼肝脏和脾脏细胞的原代培养及传代培养	156
4.3.2 EGFP 基因的表达	158
4.4 讨论	160
4.4.1 大黄鱼原代细胞培养及传代培养	160
4.4.2 大黄鱼基因转染	161
参考文献	161
第五章 结论与展望	163

5.1 结论.....	163
5.2 创新点.....	164
5.3 展望.....	164
致谢	165
在学期间参加的科研项目及成果.....	166

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract	IV
List of abbreviation	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Technology for induced pluripotent stem cells (iPSCs)	1
1.1.1 Classical DNA method	1
1.1.2 Protein method	1
1.1.3 Small molecular compounds method	2
1.1.4 Sendai virus method	2
1.1.5 RNAs method	2
1.2 Pluripotency factors	6
1.2.1 Oct4	6
1.2.2 Sox2	8
1.2.3 Klf4	11
1.2.4 cMyc	13
1.3 Objectives and significance	14
1.3.1 Objectives and significance	14
1.3.2 Technology roadmap	16
References	16
Chapter 2 Cloning and analysis of pluripotency factors in	
<i>Larimichthys crocea</i>	<i>32</i>
2.1 Materials	32
2.1.1 Experimental fishes	32
2.1.2 Chemicals and reagents	32
2.1.3 Instrument	33

CONTENTS

2.1.4 Solution preparation	33
2.1.5 Primer	33
2.2 Methods	36
2.2.1 Extraction of total RNAs	36
2.2.2 Reverse transcription of RNAs	36
2.2.3 Cloning of full length cDNA sequence of target genes	37
2.2.4 Recycling and purification of PCR products	38
2.2.5 Ligation to vector	39
2.2.6 Transformation and screening of competent cell	39
2.2.7 Detection of positive clones	39
2.2.8 Sequencing of plasmid DNA	40
2.2.9 Obtaining of full length cDNA of target genes	40
2.2.10 Bioinformatics analysis of target genes	40
2.3 Results	41
2.3.1 Analysis of cDNA sequence, amino acid sequence and phylogeny of <i>Lc-Oct4</i> gene	41
2.3.2 Analysis of cDNA sequence, amino acid sequence and phylogeny of <i>Lc-Sox2</i> gene	48
2.3.3 Analysis of cDNA sequence, amino acid sequence and phylogeny of <i>Lc-Klf4</i> gene	54
2.3.4 Analysis of cDNA sequence, amino acid sequence and phylogeny of <i>Lc-cMyc</i> gene	62
2.4 Discussion	69
2.4.1 <i>Lc-Oct4</i> gene	69
2.4.2 <i>Lc-Sox2</i> gene	71
2.4.3 <i>Lc-Klf4</i> gene	72
2.4.4 <i>Lc-cMyc</i> gene	73
References	75
 Chapter 3 Spatio-temporal expression of pluripotency factors in	
<i>Larimichthys crocea</i>	79
3.1 Materials	79
3.1.1 Experimental fishes	79

CONTENTS

3.1.2 Chemical and reagents.....	80
3.1.3 Instrument.....	81
3.1.4 Solution preparation	81
3.1.5 Primer	82
3.2 Methods	84
3.2.1 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)	84
3.2.2 <i>In situ</i> hybridization.....	85
3.3 Results	90
3.3.1 Spatio-temporal expression pattern of <i>Lc-Oct4</i> gene	90
3.3.2 Spatio-temporal expression pattern of <i>Lc-Sox2</i> gene	100
3.3.3 Spatio-temporal expression pattern of <i>Lc-Klf4</i> gene	107
3.3.4 Spatio-temporal expression pattern of <i>Lc-cMyc</i> gene	117
3.3.5 Comparison of expression patterns among pluripotency factors.....	128
3.4 Discussion	132
3.4.1 <i>Lc-Oct4</i> gene.....	132
3.4.2 <i>Lc-Sox2</i> gene.....	134
3.4.3 <i>Lc-Klf4</i> gene	136
3.4.4 <i>Lc-cMyc</i> gene.....	139
3.4.5 Comparison of gene expression patterns among pluripotency factors	142
References	143
Chapter 4 Preliminary study of iPSCs in <i>Larimichthys crocea</i>	151
4.1 Materials	151
4.1.1 Experimental fishes	151
4.1.2 Chemical and reagents.....	151
4.1.3 Instrument.....	152
4.1.4 Solution preparation	152
4.2 Methods	153
4.2.1 Cell culture	153
4.2.2 Gene transfection.....	154
4.3 Results	156

CONTENTS

4.3.1 Cell primary culture and subculture of liver and spleen in <i>Larimichthys crocea</i>	156
4.3.2 Expression of EGFP gene.....	158
4.4 Discussion	160
4.2.1 Cell primary culture and subculture in <i>Larimichthys crocea</i>	160
4.2.2 Gene transfection in <i>Larimichthys crocea</i>	161
References	161
Chapter 5 Conclusions and prospects	163
5.1 Conclusions	163
5.2 Innovation	164
5.3 Prospects	164
Acknowledgements	165
Research projects and achievements	166

摘要

通过 iPSCs 技术获得 iPSCs, 建立个体特异的多能干细胞系, 可为生长发育、种质资源保护、疾病防治及药物筛选研究等提供宝贵的实验材料, 是一条新的从根本上解决大黄鱼养殖中的各种难题的有效策略模式。其中, 多能性因子对 iPSCs 技术的研究是必不可少的, 它们在调控胚胎干细胞 (ESCs) 的自我更新和多能性、原始生殖细胞 (PGCs) 的形成、早期胚胎发育、生殖细胞发生、器官发生、再生及增殖、生长、分化、凋亡等细胞过程等方面发挥重要作用。然而关于大黄鱼多能性因子的研究尚属空白。本文采用 SMART-RACE 技术克隆了大黄鱼 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *cMyc* 四个多能性基因, 并进行了生物信息学分析; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术和原位杂交技术研究了大黄鱼四个多能性基因的时空表达模式; 还对组织细胞培养和基因转染进行了初步研究。主要研究成果如下:

1. 克隆获得了大黄鱼 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *cMyc* 4 个多能性基因。*Lc-Oct4* 基因 cDNA 全长 2642bp, 5' 端非编码区 (5' UTR) 长 623bp, 3' UTR 长 567bp, 开放阅读框 (ORF) 编码一个 476 个氨基酸 (aa) 的蛋白, *Lc-Oct4* 蛋白的 N-端和 C-端各有一个保守的 DNA 结合区—POUs 区和 HOX 区; 系统进化分析表明, 大黄鱼 *Lc-Oct4* 蛋白序列与硬骨鱼的一致性高 (65-85%), 与四足动物的一致性低 (38-65%), 在进化树上大黄鱼 *Lc-Oct4* 蛋白最先与半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 聚支。*Lc-Sox2* 基因 cDNA 全长 2135bp, 5' UTR 长 498bp, 3' UTR 长 646bp, ORF 编码一个 322aa 的蛋白, *Lc-Sox2* 蛋白具有一个高度保守的 DNA 结合区—HMG 盒; 系统进化分析表明, *Lc-Sox2* 蛋白序列在脊椎动物中的一致性都很高 (77-98%), 进化树上 *Lc-Sox2* 蛋白最先与红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 聚支。*Lc-Klf4* 基因 cDNA 全长 2404bp, 5' UTR 长 255bp, 3' UTR 长 790bp, ORF 编码一个 452aa 的蛋白, *Lc-Klf4* 蛋白具有三个高度保守的 DNA 结合区—C2H2 锌指结构; 系统进化分析表明, *Lc-Klf4* 蛋白序列与硬骨鱼的一致性高 (66-93%), 与四足动物的一致性低 (<48%), 进化树上 *Lc-Klf4* 蛋白最先与深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partitus*) 聚支。*Lc-cMy* 基因 cDNA 全长 2089bp, 5' UTR 长 338bp, 3' UTR 长 408bp, ORF 编码一个 440aa 的蛋白, *Lc-cMyc* 蛋白具有一个特征性的高

度保守的 HLH-LZ 作为 DNA 结合区；系统进化分析表明，*Lc-cMyc* 蛋白序列与硬骨鱼的一致性高（71-91%），与四足动物的一致性低（54-60%），进化树上 *Lc-cMyc* 蛋白最先与舌齿鲈（*Dicentrarchus labrax*）和革首南极鱼（*Notothenia coriiceps*）聚支。

2. 组织表达：qRT-PCR 分析显示，*Lc-Oct4* 基因在大黄鱼卵巢中呈现超高量的表达，并在 635dph 卵巢中的表达量最高；原位杂交结果也表明，*Lc-Oct4* 基因主要分布于不同发育阶段卵母细胞的细胞质中，并在第 II 期晚期和第 III 期卵母细胞中的表达水平最高；*Lc-Oct4* 基因在精原细胞和初级精母细胞中也有一定量的表达。*Lc-Sox2* 基因主要高表达于脑、鳃、胃、性腺中，且在脑和眼中的表达具有性别差异，雌性高于雄性。*Lc-Klf4* 基因在组织中广泛表达且具有性别差异，在雌鱼中的表达水平依次为脑>鳃>眼>心，在雄鱼中为心>精巢>鳃>脑，其中，在心、鳃、精巢中的表达为雄鱼>雌鱼，在眼中则为雌鱼>雄鱼；*Lc-Klf4* 基因在精巢中的表达以 635dph 中的水平最高，且主要分布于精母细胞中。*Lc-cMyc* 基因表达的性别差异仅存在于性腺中，*Lc-cMyc* 基因特异性地极高量表达于卵巢中，且在 635dph 卵巢中的表达水平最高，主要分布于第 II 期晚期和第 III 期早期卵母细胞的细胞质中；在头肾和精巢中也有一定量的表达。

3. 胚胎表达：qRT-PCR 分析表明，*Lc-Oct4* 基因在胚胎发育过程中的表达水平依次为多细胞期>囊胚期=原肠胚期；整胚原位杂交（WISH）结果也显示，*Lc-Oct4* 基因仅在从 2-细胞期至早期原肠胚的早期胚胎发育阶段表达，且在 16-细胞期达到峰值。*Lc-Sox2* 基因属于合子型的表达模式，从囊胚期开始呈动态的表达，其中在原肠胚期和胚孔封闭期的表达量水平高，在孵出后 1 天的仔鱼中 *Lc-Sox2* 基因主要表达于胚胎的头部和 PGCs 区。*Lc-Klf4* 基因呈现合子型的表达模式，从原肠胚晚期开始表达，在胚孔封闭期、眼泡出现期和晶体出现期中的表达水平高；WISH 结果也显示，*Lc-Klf4* 基因主要分布于晚期胚胎的背部和头部。*Lc-cMyc* 基因在各胚胎期中均有不同程度的表达，在早期胚胎发生中（2-细胞期—多细胞期），*Lc-cMyc* 基因的表达水平非常高，在 2-细胞期达到峰值；在胚胎发生晚期（囊胚期—孵出后 1 天的仔鱼），*Lc-cMyc* 基因的表达水平依次为孵出后 1 天的仔鱼>孵出前期>眼泡出现期=多细胞期>心跳期，随着胚胎的发育，*Lc-cMyc* 基因逐渐向胚胎背部聚集，最后主要分布于胚胎头部。

4. 采用Lipofectamine 2000脂质体将pAc5.1B-EGFP质粒成功转染到大黄鱼肝脏和脾脏的原代细胞中，转染率达到25-30%。

关键词：多能性因子；大黄鱼；实时荧光定量 PCR；原位杂交；基因转染

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Establishment of individual specific pluripotent cell lines by iPSCs obtained through iPSCs technology is very important for the study of growth and development, germplasm resources protection, disease prevention and drug screening, etc, which can provide valuable experimental materials for these researches. Thus, it is a new effective strategy pattern for radically resolving the various problems in cultured *Larimichthys crocea*. Among them, the pluripotency factors are indispensable on iPSCs technology research which play vital roles in controlling self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells (ESCs), formation of primordial germ cells (PGCs), early embryonic development, gonadal germ cells, embryogenesis, organogenesis, regeneration and cellular processes such as proliferation, differentiation, development and apoptosis, etc. However, study of pluripotency factors in *L. crocea* has not yet been carried out. In this paper, we cloned *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *cMyc* gene of *L. crocea* by SMART-RACE technology and analyzed the structures by bioinformatics method; we also studied the spatio-temporal expression patterns of four pluripotency factors by qRT-PCR and *in situ* hybridization; moreover, tissue cells culture and gene transfection were studied preliminarily. The main results exhibited as follows:

1. *Lc-Oct4*, *Lc-Sox2*, *Lc-Klf4* and *Lc-cMyc* gene were cloned by SMART-RACE technology. The full-length cDNA of *Lc-Oct4* gene is 2642bp including a 623bp 5' untranslated region (UTR), a 567bp 3' UTR and a 1431bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 476 amino acids (aa); There are two conserved functional domains, N-POUs domain and C-HOX domain as DNA-binding domain in N-terminus and C-terminus respectively in *Lc-Oct4* protein; Phylogenetic analysis showed that *Lc-Oct4* protein shares high identity with teleosts (65-85%), low identity with tetrapods (38-65%) and clustered first with *Cynoglossus semilaevis* in evolutionary tree. The full-length cDNA sequence of *Lc-Sox2* gene is 2135bp,

containing a 498bp 5'UTR, a 646bp 3' UTR and an ORF encoding a protein of 322aa; *Lc-Sox2* protein possesses a highly conserved HMG-box as DNA-binding domain, a group B motif and a Ser-rich domain; Phylogenetically, *Lc-Sox2* maintains high identity with vertebrates (77-98%), particularly with teleosts (83-98%), and clustered first with *Takifugu rubripes* in evolutionary tree. The full-length cDNA sequence of *Lc-Klf4* gene is 2404bp, containing a 255bp 5'UTR, a 452bp 3' UTR and a ORF encoding a protein of 452aa; *Lc-Klf4* protein contains three highly conserved C2H2 Zinc fingers (ZnF-C2H2) as DNA-binding domain; Phylogenetically, *Lc-Klf4* shares high identity with teleosts (66-93%), but low with tetrapods (<48%), and clustered first with *Stegastes partitu* in evolutionary tree. The full-length cDNA of *Lc-cMyc* gene is 2089bp encoding a protein of 440aa; *Lc-cMyc* protein has the characteristic helix-loop-helix-leucine-zipper (HLH-LZ) as DNA-binding domain; Phylogenetically, *Lc-cMyc* protein shares high identity with teleosts (71-91%), but low with tetrapods (54-60%), and clustered first with *Dicentrarchus labrax* and *Notothenia coriiceps* in evolutionary tree.

2. The expression in tissues: The results of qRT-PCR in tissues showed that *Lc-Oct4* gene was only expressed strongly in ovary with the highest expression level in 635dph ovary during ovarian development; The *in situ* hybridization analysis of gonads showed that *Lc-Oct4* gene had specially high expression in the cytoplasm of oocytes in different developmental stages with the highest level in stages II (later) and III oocytes; *Lc-Oct4* gene was also expressed in cytoplasm of spermatogonium and primary spermatocyte of testis. qRT-PCR analysis of tissues showed that *Lc-Sox2* gene was expressed highly in brain, gill, stomach and gonad with gender difference in brain and eye (female > male). *Lc-Klf4* gene was expressed widely in adult tissues with gender difference, the order was showed as follows: brain > gill > eye > heart in female, heart > testis > gill > brain in male, male > female in heart, gill, and testis, female > male in eye; During growth, the expression of *Lc-Klf4* gene first rose then declined in testis and rose till 635dph in brain; Besides, *Lc-Klf4* gene was widely and highly distributed in different developmental spermatids especially in spermatocytes.

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.